

Max-Plank-Institut für Experimentelle Medizin
Göttingen

Ehem. Direktor: Professor Dr. Dr. W. Koll

Institut für Klinische Chemie

der Justus Liebig-Universität Gießen

Leiter: Professor Dr. L. Róka

**Über den Nachweis und ein Verfahren
zur Anreicherung von
Tyrosin- α -Ketoglutarat-Aminotransferase
aus menschlicher Plazenta**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Justus Liebig-Universität zu Gießen

vorgelegt von

Hans Bernd Pralle

aus Bremen

Gießen 1969
—

Max-Planck-Institut für Experimentelle Medizin
Göttingen
Ehem. Direktor: Professor Dr. Dr. W. Koll
Institut für Klinische Chemie
der Justus Liebig-Universität Gießen
Leiter: Professor Dr. L. Röka

Über den Nachweis und ein Verfahren
zur Anreicherung von
Tyrosin- α -Ketoglutarat-Aminotransferase
aus menschlicher Plazenta

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig-Universität zu Gießen

vorgelegt von
Hans Bernd Pralle
aus Bremen

Gießen 1969

Dekan: Prof. Dr. H. Rettig
Referent: Prof. Dr. L. Róka
Correferent: Prof. Dr. H. A. Kühn

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Oktober 1969



INHALT

	Seite
I. EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG	2
II. MATERIALIEN UND METHODEN	4
A. MATERIALIEN	4
B. METHODEN	6
1. Messung der Enzymaktivität	6
a. Messung von p-Hydroxyphenylpyruvat im modifizierten Ansatz nach Briggs	7
b. Messung von p-Hydroxyphenylpyruvat über p-Hydroxybenzaldehyd	8
c. Papierchromatographische Trennung von ^{14}C -L-Tyrosin und dem Reaktionsprodukt	12
2. Proteinbestimmung	13
III. ERGEBNISSE	14
A. PRÄPARATION VON PLAZENTAFRAKTIONEN MIT ANGEZEICHERTER TYROSINTRANSAMINASEAKTIVITÄT	14
B. ENZYMAUSBEUTEN UND EIGENSCHAFTEN EINIGER FRAKTIONEN AUS PLAZENTA	20
IV. DISKUSSION	23
V. ZUSAMMENFASSUNG	25
VI. LITERATUR	26
ABKÜRZUNGEN	30

1. EINFÜHRUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die L-Tyrosin- α -ketoglutarat-aminotransferase (E.C. 2.6.1.5.) - im folgenden Text wird der Kurzname Tyrosintransaminase verwendet - ist eines der Enzyme aus Säugetiergewebe, deren Aktivitätsregulation und wechselnd starke Biosynthese häufig untersucht worden sind.

Nachdem die ausgeprägte Induzierbarkeit der Rattenlebertyrosintransaminase durch L-Tyrosin (1,2,3) und durch Corticosteroidhormone (4,5,6,7,8) erkannt worden war, wurde dieses Enzym zu Untersuchungen über die Regulation auf der Ebene der Enzymsynthese beim Säugetier herangezogen (9).

Zu den in Tierversuchen erhobenen Befunden kamen neuere, auch widersprüchliche Beobachtungen, die an einer Zellkultur von Rattenlebertumorzellen gemacht werden konnten; die Enzymsynthese ist auch hier durch Corticosteroidhormone beeinflussbar (10,11).

Aufschlußreich waren die Versuche am Tier wie an der Zellkultur, in denen die Spontansynthese und die Synthese unter dem Einfluß eines Induktors mit Hilfe radioaktiver Schlüsselsubstrate (11,12) oder mit spezifischen Hemmern wie Actinomycin D, Mitomycin D, Cytosin-arabinsid und Actidion (13,14,15) für bestimmte Vorstufen der Enzymbiosynthese durchgeführt und verglichen wurden. Die Ergebnisse hieraus gaben Anlaß zu unterschiedlichen Hypothesen über die Angriffspunkte von verschiedenen, die Enzymaktivität steuernden Substanzen.

Ein Einfluß des Cortisols auf die mRNA-Bildungsrate erscheint aber weitgehend gesichert (7,8).

Das Enzymaktivität induzierende Substrat L-Tyrosin soll ebenfalls über eine gesteigerte mRNS-Bildung eine vermehrte Synthese des Enzyms auslösen (8).

Weitere noch eindeutigere Aussagen über Wirkorte von Enzyminduktoren sind nur von einer in den Einzelstufen kontrollierbaren Enzymsynthese in zellfreien Teilsystemen zu erwarten.

Weil die Untersuchungen von Regelmechanismen an Systemen aus menschlichem Gewebe möglicherweise auch praktische Bedeutung gewinnen, wird in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob aus der menschlichen Plazenta als Beispiel eines gesunden Gewebes eine Tyrosintransaminaseaktivität angereichert werden kann. Bei Verwendung der Plazenta erhält man nahezu jederzeit und in ausreichender Menge menschliches Untersuchungsgut. Es wurden auch bereits Teilsysteme aus menschlicher Plazenta entwickelt, die gute Aktivitäten in Einzelschritten der Proteinbiosynthese zeigen, (16,17,18).

Wenn man von einer gewissen Schwankungsbreite der spezifischen enzymatischen Aktivität der Rohextrakte absieht und berücksichtigt, daß die Tyrosintransaminase nur in sehr geringer Konzentration in dem Gewebe vorliegt, können die bisherigen Erfolge in der Anreicherung des Enzyms aus der menschlichen Plazenta befriedigen.

Die Anwesenheit von Tyrosintransaminaseaktivität war mit dem angewendeten Testverfahren nach einer etwa vierfachen Anreicherung schlüssig festzustellen. Eine weitere Reinigung mußte erfolgen, um eine volle Substratabhängigkeit der enzymatischen Aktivität nachweisen zu können.

Der Versuch, die Tyrosintransaminaseaktivität mit Hilfe eines neu zu entwickelnden hochempfindlichen radioaktiven Tests nachzuweisen, wurde nicht über die Erprobung mit Rattenleber- und wenigen Plazentarohextrakten hinaus fortgeführt, da damals gerade ein genügend empfindlicher optischer Test bekannt wurde (19).

Trotzdem soll das chromatographische Verfahren angegeben werden, da bis in die letzte Zeit kaum ein handlicher Test mit radioaktivem Substrat bekannt ist (20).

11. MATERIALIEN UND METHODEN

A. Materialien

1. Wir verwendeten in Vorversuchen mit verschiedenen Nachweismethoden Rattenlebern aus Tieren, an deren Bradikininversuche in einem kurzen, abgeschnürten Duodenalabschnitt durchgeführt worden waren. Sie wurden sofort nach dem Entbluten der Tiere entnommen und in eiskaltem Homogenisiermedium (entsprechend Puffer I des Präparationsschemas Abb.3) schonend mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator zerkleinert. Ein 1000xg Überstand lieferte die Enzymaktivität und wurde ausgiebig dialysiert.
2. Die Plazenten erhielten wir aus den geburtshilflichen Abteilungen der Universitätsfrauenklinik sowie der Krankenhäuser Neu-Bethlehem und Neu-Mariahilf in Göttingen, die alle in etwa fünf Minuten vom Institut aus erreichbar sind. Die Plazenten wurden sofort in eisgefüllte Dewar-Gefäße verpackt, schnell transportiert und verarbeitet. (Siehe Plazentapräparation III, A).
3. Die Chemikalien wurden in der reinsten käuflichen Form ohne weitere Reinigung verwendet. (vgl. Tabelle auf Seite 5).

Die wässrigen Lösungen sowie die Säulenchromatographien wurden mit doppelt quartz-destilliertem Wasser angesetzt. Folgende Konzentrationen wässriger Lösungen wurden verwendet: 5 mM L-Tyrosin, 100 mM α -Ketoglutar säure und 0,5 - 5 mM Pyridoxalphosphat. Die Amino- und Ketosäurelösungen wurden mit Kalilauge neutralisiert. Vom Pyridoxalphosphat empfahl es sich, am Gebrauchstag eine frische Lösung anzusetzen. Verwendete man eine einmal eingefrorene Lösung, so lagen die zu messenden Enzymaktivitäten um 30 % niedriger als bei Verwendung einer frischen bei Zimmertemperatur aufbewahrten Lösung.

Dadurch dürfte sich auch der erhöhte Bedarf an Pyridoxalphosphat erklären, der sich bei eingefrorenen Enzymfraktionen zeigte. Extinktionen wurden in einem Zeiss-Spektralphotometer PMQ II gemessen.

Messungen der Radioaktivität erfolgten im TRICARB Liquid Scintillation Counter (Packard Instruments) in Toluol mit 0,4 % PPO (2,5-Diphenyloxazol, Scintillation Grade, Packard) und 0,01 % POPOP (1,4-bis-2-(5-Phenyloxazoly)-Benzol, Scintillation Grade, Packard).

1. L-Tyrosin	Schwarz-Bioresearch
2. α -Ketoglutar säure	Boehringer
3. p-Hydroxyphenylpyruvat	Fluka
4. p-Hydroxybenzaldehyd	
5. Diäthylidithiocarbamat	
6. β -Mercaptoäthanol	
7. Pyridoxalphosphat	E. Merck
8. Ammoniumsulfat, LAB für biochem. Zwecke	
9. Folin-Ciocalteus Reagenz	
10. Kaliumnatrium-Tartrat	
11. Kupfersulfat	
12. Methanol	
13. n-Butanol	Riedel de Haen
14. Natriumacetat	
15. Kaliumchlorid	
16. prim. Kaliumphosphat	
17. sek. Kaliumphosphat	
18. Dithiothreitol (Cleland's Reagenz)	Calbiochem
19. DEAE-Cellulose, Kap. 0,64m ² qu/g	Serva
20. CM-Cellulose, Kap. 0,88m ² qu/g	
21. Rinderserumalbumin, reinst, krist.	
22./23. Sephadex G 25 und G 75	Pharmacia
24. ¹⁴ C-L-Tyrosin 475 Ci/Mol	Radiochemical Center Amersham, England
25./26. PPO/POPOP	Packard Instruments
27. Whatman 3MM Papier	Hormuth u. Vetter

B. Methoden

1. Messung der Enzymaktivität

Mehrere Testverfahren zur Bestimmung der Tyrosintransaminase-aktivität wurden an Rattenleberhomogenaten erprobt und auf ihre Anwendbarkeit in Plazentafraktionen überprüft.

Die jeweils betrachtete Reaktion ist die Übertragung der α -Aminogruppe des L-Tyrosins auf das α -Ketoglutarat, das damit unter Bildung von para-Hydroxyphenylpyruvat (pHPP) in Glutamat übergeführt wird (Abb.1). Jeder einzelne Reaktionspartner kann getrennt bestimmt werden.

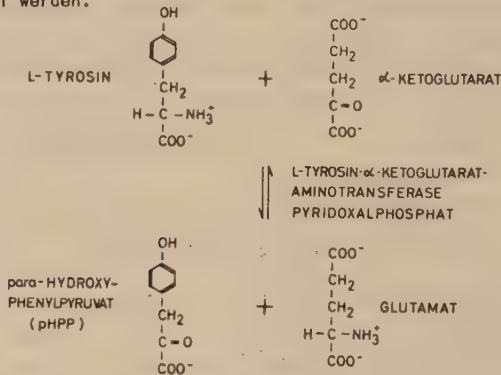


Abb. 1. Reaktionspartner der durch L-Tyrosin- α -ketoglutarat-Aminotransferase katalysierten Reaktion

Die Messung der Enzymaktivität in rohen Fraktionen aus Plazenta ist durch den niedrigen Gehalt des Gewebes an diesem Enzym erschwert.

Die Testverfahren wurden nach der voraussichtlichen Empfindlichkeit und Schnelligkeit der Handhabung aus den in der Literatur angegebenen Verfahren ausgewählt, da sie zunächst zur Überprüfung der Anreicherung der erwarteten, sehr geringen enzymatischen Aktivität dienen sollten.

Viele Verfahren standen zur Verfügung (20,21,22,23,24,25,26,27,19). Aus den eben erwähnten Gründen wurden die photometrischen Aktivitätsbestimmungen bevorzugt. Sie boten aber nur dann eine ausreichende Empfindlichkeit, wenn das Protein vor der Messung gefällt wurde. Die Bestimmungen wurden daher an Aliquoten vorgenommen, die den Reaktionsgemischen zu festen Zeiten entnommen und enteiweißt worden waren.

a. Messung von p-Hydroxyphenylpyruvat (pHPP) im modifizierten Ansatz nach Briggs

Wegen der guten Ergebnisse in Vorversuchen mit Rattenleberextrakten wurde das Verfahren der p-HPP-Messung im modifizierten Ansatz nach Briggs (25) auch an Fraktionen aus Plazenta erprobt. Es beruht auf der Messung der Farbtiefe des blauen Phosphomolybdat-Komplexes, der sich bei 20°C in einer Stunde nach Zugabe des Farbreagens unter Einwirkung der beiden Formen - Keto- und Enolform - des enzymatisch gebildeten pHPPs entwickelt hat. Das Protein mußte vorher durch eine TCE-Fällung entfernt werden.

Die Reaktionsvolumina betrugen 1 ml. Es wurden Mikrotrogküvetten von 1 cm Schichtdicke verwendet. Die eingesetzten Konzentrationen und die Pipettierfolge sind in Tabelle 1 angegeben.

Tab. 1: Pipettierfolge und Testverlauf, modifiziert nach Briggs

Nr.	Substanz	Menge	Konz.	Endkonz.
<u>Enzymreaktivierung</u>				
1.	Pyridoxalphosphat	20µl	5mM	0,1mM
2.	Enzymfraktion (dial.)	20-200µg	Protein	
3.	L-Tyrosin	200µl	5mM	1 mM
<u>Enzym-Substratumssetzung</u>				
4.	Diäthylthiocarbamat*	-	100mM	-
5.	Na-Phosphat pH 7,35 ad	1000µl	50mM	-
6.	α-Ketoglutarat	100µl	10mM	1 mM
<u>Deproteinisierung</u>				
7.	Trichloressigsäure	100µl	100 %	10 %
<u>pHPP-abhängige Molybdatfärbung</u>				
a.	Überstand der TCE-Fällung			500µl
b.	Farbreagens			500µl
	(*Mischung aus:			
	Ammoniummolybdat	3 % in 5N HCl		250µl
	Kaliumdihydrogenphosphat)	1 % in H ₂ O		250µl

*Für Plazenta nicht benötigt.

Der Start der Reaktion erfolgte durch Zugabe des α -Ketoglutarats. Inkubiert wurde bei 37°C. Die enzymatische Reaktion wurde mit einer Proteinfällung durch TCE beendet. Das mit TCE gefällte Protein wurde in 10 Min. bei 1000xg abzentrifugiert. 0,5 ml des Überstands wurden 0,5 ml eines frisch angesetzten Reagens aus einer 3%igen Ammoniummolybdatlösung in 5 N HCl und einer 1%igen wässrigen Kaliumdihydrogenphosphatlösung zugefügt. Das Reaktionsgemisch verblieb genau eine Stunde bei Zimmertemperatur. Die Messung der blau gefärbten Lösung erfolgte bei 830 nm gegen einen Zeitnullwert.

Der molare Extinktionskoeffizient beträgt bei dieser Wellenlänge für pHPP etwa 4000 (25). Der Test wies in Mehrfachbestimmungen eine ausgezeichnete Genauigkeit mit maximalen Abweichungen unter $\pm 6\%$ auf, wenn die standardisierten Bedingungen genau eingehalten werden.

Er eignet sich besonders für p-HPP-oxidasehaltige Rohextrakte, da er die Verwendung von Diäthylthiocarbamat (DDC), einem Hemmstoff dieses Enzyms, zuläßt. Bei den Arbeiten mit Plazentaextrakten wurde es nicht benötigt.

Es konnte keine meßbare p-HPP-Oxidasewirkung festgestellt werden.

Der Test hatte sich in Untersuchungen über die Spezifität der Tyrosintransaminase aus Rattenleber als wenig störanfällig erwiesen (29).

b. Messung des p-Hydroxyphenylpyruvat (pHPP) über p-Hydroxybenzaldehyd (pHBA)

Während der Arbeiten mit Plazentaextrakten wurde eine neue Bestimmungsmethode bekannt (19). Nach der Erprobung an einigen Plazentafraktionen wie einer pH-5-Fraktion, Ribosomenfraktionen und Proteinfraaktionen, die durch Waschen von Ribosomen mit 1,5M-3M Harnstoff oder 0,3-0,5 M Ammoniumsulfat erhalten wurden, konnten die weiteren Untersuchungen mit dieser empfindlicheren Bestimmungsmethode durchgeführt werden.

Sie beruht auf der seit langem bekannten Spaltung und Oxydation des pHPP unter Verbrauch von OH^- und molekularem Sauerstoff im stark alkalischen Milieu, bei der Oxalat und p-Hydroxybenzaldehyd (pHBA) entstehen (Abb.2).

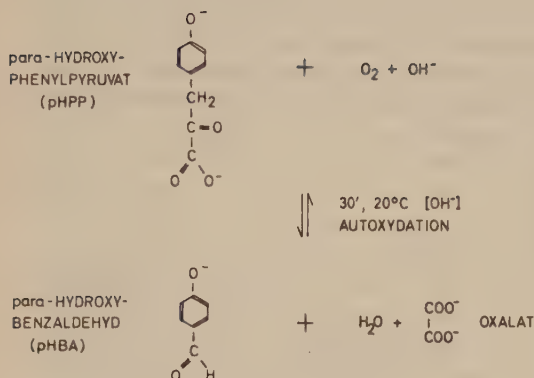


Abb.2. Für die Extinktionsmessung angeschlossene Reaktion: Bildung von p-Hydroxybenzaldehyd (pHBA) aus p-Hydroxyphenylpyruvat (pHPP).

Das Reaktionsprodukt pHBA absorbiert Licht von 331 nm sehr stark (28). In der Literatur wird für das Extinktionsmaximum des pHBA ein molarer Extinktionskoeffizient von 25.000-27.000 angegeben. Im Anschluß an mehrere Untersuchungen sollte für das pHPP eine Umsetzung in pHBA zu 66 % angenommen werden können. Daraus leitete sich dann ein molarer Extinktionskoeffizient von etwa 17.500 bei 331 nm für das entstandene Mol pHPP ab. Zur Eichung wurde im Handel erhältliches pHPP und pHBA direkt zur photometrischen Messung in 1N KOH oder im Milieu des nicht inkubierten Ansatzes eingesetzt. Für das pHBA ergab sich mit 29.500 bei 331 nm annähernd der bekannte molare Extinktionskoeffizient; für pHPP wurde bei der gleichen Wellenlänge aber nur ein Wert von wenig unter 10.000 gefunden, was einem Umsetzungsgrad von etwa 35 % entspricht (Abb.3).

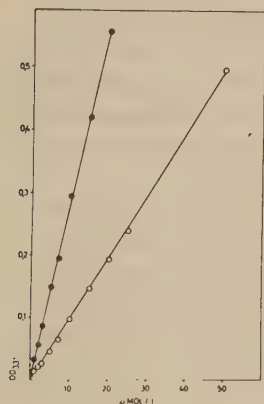


Abb.3. Eichkurve zum Umsetzungsgrad von p-Hydroxyphenylpyruvat (pHPP) in p-Hydroxybenzaldehyd (pHBA) im alkalischen Milieu.

In Ansätzen nach Tabelle 2, jedoch ohne Enzymzugabe, wurde käufliches pHPP oder pHBA in steigenden Konzentrationen eingesetzt und nach 30 Min. die OD₃₃₁ bestimmt.

Damit weist der Test gegenüber dem zuerst erwähnten, der für die molare Lösung von gebildetem PHPP eine Extinktion von 4,000 erbringt, eine zweieinhalbfach gesteigerte Empfindlichkeit auf. Hinzu kommt, daß die photometrische Messung schon dreißig Minuten nach dem Stoppen der Reaktion vorgenommen werden kann. Bei dem unempfindlicheren Verfahren beträgt die Wartezeit eine Stunde (Abb.4).

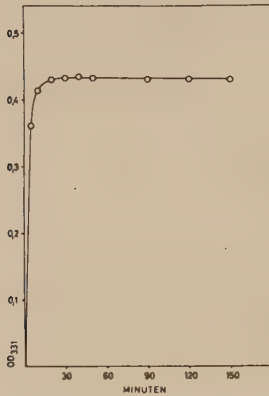


Abb.4. Stabilität des aus p-Hydroxyphenylpyruvat erzeugten p-Hydroxybenzaldehyd im alkalischen Milieu. Ein der Tabelle 2 entsprechender Ansatz wurde mit Rattenleber 30 Min. inkubiert. Während 2,5 Stunden nach Zugabe der KOH wurde die Bildung des bei 331 nm absorbierenden pHBA verfolgt.

Der Test ist in der Originalvorschrift so angegeben, daß auf die Fällung des Proteins wegen des stark alkalischen Milieus verzichtet und also die Extinktion der proteinhaltigen, aber transparenten Lösung direkt gemessen werden kann.

Dieser Vorteil konnte bei unserer Arbeit mit Fraktionen aus der Plazenta nur selten ausgenutzt werden, weil die hierbei benötigte Proteinmenge der Rohfraktionen einen zu großen Blindwert lieferte. Bei den Fraktionen mit genügend hoher spezifischer Enzymaktivität (Stufen VI und VII, vgl. Abb.6) konnte aber ebenfalls auf das Füllen und Abzentrifugieren des Proteins verzichtet werden.

Der für die Aktivitätsmessungen in Plazentafraktionen verwendete Ansatz enthielt in einem Gesamtgemisch von 1 ml die in Tab. 2 angegebenen Substanzen und Konzentrationen.

Tab. 2: Messung von Tyrosintransaminase über p-Hydroxabenaldehyd

Nr.	Substanz	Volumen	Konz.	Endkonz.
1.	¹⁾ Pyridoxalphosphat	2 μ l	0,1 <u>M</u>	²⁾ 0,2 <u>mM</u>
2.	Dithiothreitol	10 μ l	0,1 <u>M</u>	1,0 <u>mM</u>
3.	L-Tyrosin	100 μ l	5,0 <u>mM</u>	0,5 <u>mM</u>
4.	Kaliumphosphat pH 7,35 incl. 1-8 ad	1000 μ l	50,0 <u>mM</u>	
5.	Rinderserumalbumin	20 μ l	10 <u>mg/ml</u>	2 <u>mg/ml</u>
6.	α -Ketoglutarat	10 μ l	0,1 <u>M</u>	1,0 <u>mM</u>
7.	Enzymprotein evtl. Enzympuffer zur Kompensation	20-200 μ g		
8.	Trichloressigsäure	50 μ l	100 %	5 %
9.	Kalilauge	100 μ l	10 <u>N</u>	1 <u>N</u>

1) Die Substanzen 1-6 werden als vorgefertigte "Substratansatzmischung" einpipettiert.

2) Die Konzentrationen im Inkubationsgemisch für die Enzymreaktion liegen um etwa 5 % höher, da sein Volumen vor Zusatz der Trichloressigsäure 950 μ l beträgt.

Nach Verteilen der Substratansatzmischung auf Reaktionsröhrchen (ca. 6 ml) wurden die Reaktionen durch Zugabe der Enzymfraktionen in Zeitabständen von 30 Sek. gestartet. Beendet wurden sie durch die Zugabe von Trichloressigsäure unter sofortigem Schütteln auf einem Whirlmixer. Als Nullwert für die photometrische Messung diente ein vollständiges System, dem die Trichloressigsäure jedoch kurz vor dem Enzym zugegeben worden war. Das gefällte Protein wurde in 10 Minuten bei 1000xg abzentrifugiert. 900 μ l des Überstandes wurden in mit 100 μ l Kalilauge versehene Reagenzröhrchen pipettiert. Es wurde sofort mit einem Whirlmixer gemischt. Die Extinktionsmessungen wurden frühestens nach 30 Minuten bei 331 nm gegen den Nullwert durchgeführt.

Zusatz von DDC erzeugte je nach Enzymstufe verschiedene Konzentrations- und zeitabhängige Blindwerte. Er unterblieb bei den Arbeiten mit Plazentafraktionen. (vgl. 11, B, 1, a). Die mittlere Fehlerbreite für diese Bestimmungsmethode betrug $\pm$ 5 %.

c. Papierchromatographie zur Trennung von ^{14}C -L-Tyrosin und p-Hydroxyphenylpyruvat

Papierchromatographie Verfahren bieten die Möglichkeit, eine größere Anzahl von Proben nebeneinander zu messen.

Verwendet wurde Whatman 3MM Papier in Streifen von 2 cm x 20 cm und ein Laufmittel aus Butanol, Methanol und 0,5M Natriumacetat pH 8,5 im Verhältnis 40:30:5. Die Trennung wurde in einem speziellen Tank für absteigende Schnellchromatographien durchgeführt (30). Bei einem Trennweg von 16-18 cm erlaubt das Verfahren die Abtrennung des vorauslaufenden entstandenen Produkts in etwa 150 Minuten.

Der Tank wie auch die Papierstreifen müssen eine Stunde vor dem Lauf voräquilibriert werden; das Chromatographiegemisch darf nicht mehr als 6 Stunden alt sein, sonst muß der Anteil an Methanol erhöht werden. Zur Sicherheit sollte ein Kontrolllauf aus einem bekannten Reaktionsansatz mit durchgeführt werden. Seine Laufstrecke wurde in 1-1,5 cm lange Abschnitte zerlegt und ausgezählt. Danach wurden die Papierstrecken, die das Produkt trugen, ebenfalls in 1,5cm-Abschnitte zerschnitten und deren Radioaktivität gemessen. Abb. 5a und 5b zeigen Ergebnisse einer solchen Trennung.

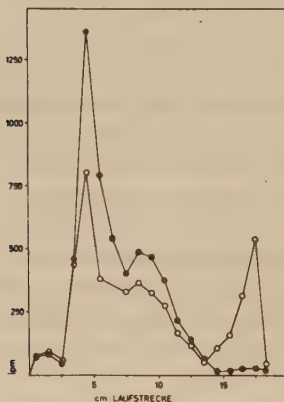


Abb. 5a. Schnellchromatographische Trennung von (^{14}C)Tyrosin und p-Hydroxyphenylpyruvat. 1:20 verkleinerter, Tabelle 2 entsprechender Ansatz. Rattenleberextrakt vergleichbar Stufe 1, 0,4 mg/ml Protein eingesetzt und 30 Min. inkubiert. —●— = Inkubation ohne Enzym; —○— = Vollständiger Ansatz.

Hierbei wurde käufliches, nicht nachgereinigtes ^{14}C -Tyrosin verwendet, das mit unmarkiertem L-Tyrosin von einer spezifischen Aktivität von

475 Ci/Mol auf 5 Ci/Mol eingestellt wurde. Die eingesetzte Tyrosinkonzentration entsprach derjenigen im photometrischen Test nach Diamondstone (s. II, B, 1, c).

Die Empfindlichkeitssteigerung durch Verwenden eines solchen radioaktiven Tests beruht auf der Verkleinerung des Reaktionsgemisches um den Faktor 20 (50 μ l-Ansätze). Weitere, allerdings kostspielige Steigerung der Empfindlichkeit ist durch Verwenden der nahezu 100-fach höheren spezifischen Aktivität möglich. Einer Verwendung von niedrigeren Substratkonzentrationen steht entgegen, daß das Enzym dabei nicht mehr mit der maximalen Umsetzungsrate arbeiten würde.

Die mit diesem Verfahren durchgeführten Versuche lieferten einen unabhängigen spezifischen Nachweis für das Vorliegen von Tyrosintransaminaseaktivität in Plazentaextrakten. (vgl. Abb. 5b).

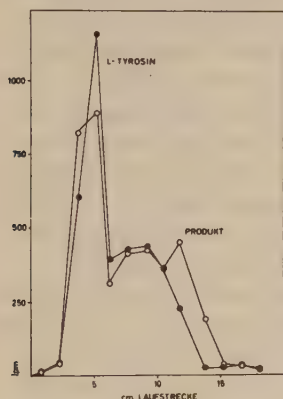


Abb. 5 b. Schnellchromatographische Trennung von ^{14}C -L-Tyrosin und p-Hydroxyphenylpyruvat. (vgl. Abb. 5a). Plazentaenzym Stufe I, 1,4 mg/ml Protein eingesetzt und 30 Min. inkubiert. (Die abgebildeten Chromatographien erfolgten zu verschiedenen Zeiten).
 —●— = Inkubation ohne Enzym; —○— = Vollständiger Ansatz.

2. Eiweißbestimmung

Der Proteingehalt der Enzymfraktionen wurde nach der Methode von Lowry et al. (31) mit Hilfe des Folin-Ciocalteus-Reagens bestimmt. Zur Eichung des Verfahrens diente Rinderserumalbumin.

III. ERGEBNISSE

A. PRÄPARATION VON PLAZENTAFAKTIONEN MIT ANGEREICHERTER TYROSIN-TRANSAMINASEAKTIVITÄT

Ein Anreicherungsverfahren für Tyrosintransaminaseaktivität wurde von Kenney (9) ausgearbeitet. Das Verfahren wurde für die Gewinnung kristallinen Enzyms aus mit Cortisol induzierten Rattenlebern modifiziert und ergänzt. Unabhängig davon wurde Tyrosintransaminaseaktivität aus Rinderschilddrüsen und -nebennieren in gereinigter Form dargestellt (32,40).

Die für die Anreicherung der Transaminase aus Rattenleber angewendeten Reinigungsschritte konnten für die Aufarbeitung der Plazentafraktionen nahezu unverändert übernommen werden. Einige Unterschiede in der Präparation empfehlen sich jedoch bei der Hitzebehandlung und den säulenchromatographischen Schritten. Bei der Beurteilung dieser Abweichungen muß berücksichtigt werden, daß im Falle der Plazenta auf allen Stufen ungleich höhere Verunreinigungen durch inaktives Protein vorlagen.

Die geringe Enzymaktivität des Ausgangsmaterials bedingte, daß die Optimierung der Präparationsschritte bis zur Hitzebehandlung an ausgewählten Plazenten vorgenommen worden ist. Nach Standardisierung des Verfahrens zeigte sich später, daß auch die Plazenten, deren Rohfraktionen in ihrer Aktivität schlecht zu beurteilen waren, nach dem behutsamen Hitzeschritt vergleichbare Mengen an Gesamtaktivität enthielten.

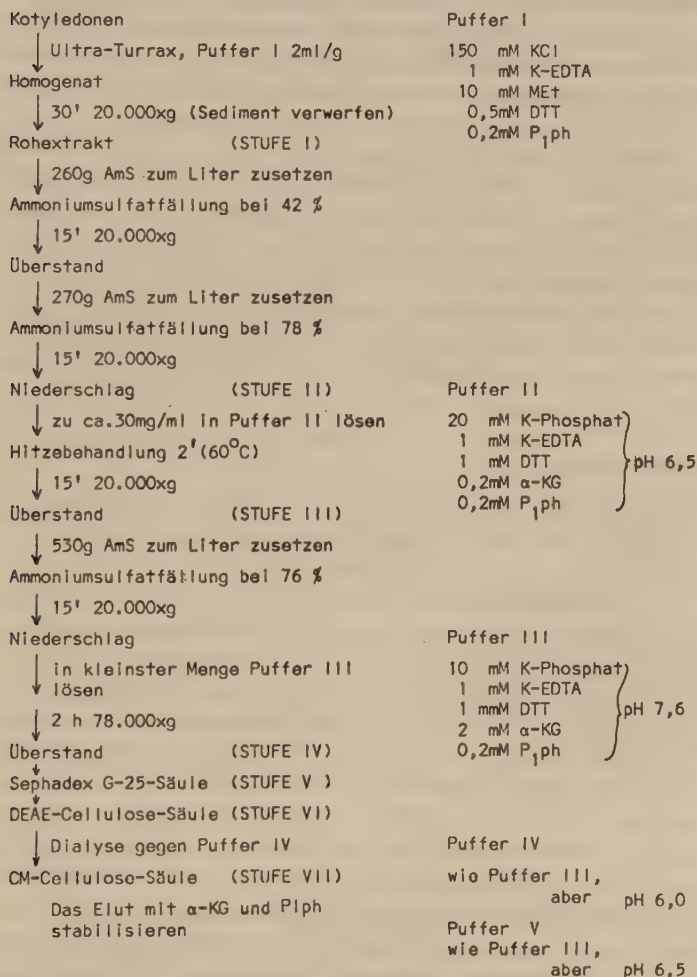
Verwendet wurden Plazenten, die nach einer Nachgeburtsperiode von weniger als 10 Minuten zu erhalten waren und schnellstens der Verarbeitung zugeführt werden konnten (Vgl. II,A). Die Präparation der Rohfraktion wurde nachts durchgeführt, da sich früh herausgestellt hatte, daß die zwischen 22.⁰⁰ und 2.⁰⁰ geborenen Plazenten mehr Enzymaktivität enthielten.

Homogenisieren

Die Aufarbeitung wurde bei 0-4°C vorgenommen. Verwendet wurde das gesamte Kolydonengewebe einer Plazenta. Dieses wurde mit einem Messer klein zerschnitten. Die Gewebebrocken wurden mit etwa 1 Liter "Waschpuffer" (150mM KCl und 1mM K-EDTA) auf einem Plastiksieb weitgehend von Blut freigespült. Die Zusammensetzung der weiteren Puffer findet sich in dem Präparationsschema (Abb. 6). Das Gewebe wurde dann nach gründlichem Abtropfen gewogen.

Abb. 6

PRÄPARATION VON TYROSINTRANSAMINASE AUS PLAZENTA



Zu je 1 g dieses Ausgangsmaterials wurden 2 ml Puffer I gegeben. In einem engen Polyäthylengefäß wurde in kurzen Intervallen bei mäßig hoher Geschwindigkeit homogenisiert. Das Homogenisiergefäß befand sich dabei in einer Kältemischung aus Eis und Kochsalz von -16° bis -18°C . Um wegen der Oberflächenempfindlichkeit des Enzyms Schaumbildung zu vermeiden, wurde mit dem Ultra-Turrax (Type T45, Firma Jahnke und Kunkel, Lahr, Schwarzwald) wie folgt gearbeitet:

Während 5 Minuten lief das Gerät für 5-7 Sek., um dann für 3-5 Sek. abgeschaltet zu werden. Da das Gerät keine feste Potentiometerskala besitzt, gebe ich die Einstellung des Drehkopfes mit 100° von 315° Winkelgraden der Höchsteinstellung an. Nach fünf Minuten Pause wurde dieses Vorgehen wiederholt. Auf diese Weise konnte die für eine befriedigende Ausbeute erforderliche Umdrehungszahl angewendet werden.

Die Homogenisatoren nach Dounce, Potter und Elvehjem konnten wegen des zähen Bindegewebsgerüsts der Plazenta nicht angewendet werden.

Zentrifugation

Schon bei den ersten Untersuchungen von Rattenleberextrakten war aufgefallen, daß Tyrosintransaminaseaktivität auch in den schnell sedimentierenden Fraktionen nachweisbar ist (21).

Aus dem Homogenat der menschlichen Plazenta ließen sich ebenfalls durch fraktionierendes Zentrifugieren zwei Fraktionen gewinnen, die sich hinsichtlich ihrer spezifischen Aktivität, besonders aber hinsichtlich des Zeitverlaufs der enzymatischen Reaktion verschieden verhielten. Außer in der 20.000xg-Überstandsfraktion bei 15 Min. Zentrifugation fanden wir in der zwischen 6.000xg und 20.000xg sedimentierenden Fraktion Enzymaktivität. Auffällig war die geradlinige Kinetik der Aktivität über 10 Min. Inkubationszeit, die sich in dieser schneller sedimentierenden Fraktion findet. Mikroskopisch besteht sie vorwiegend aus Membranfragmenten. Sie entspricht etwa der Mikrosomenfraktion. Möglicherweise läßt die Aktivitätsmessung dieser Fraktion im Vergleich zu der Gesamtaktivität wie bei anderen Enzymen Rückschlüsse auf die Syntheserate bezogen auf die Lebensdauer der enzymatischen Aktivität zu, wenn man annimmt, daß neusynthetisiertes Enzymprotein noch

membrangebunden und enzymatisch aktiv ist (33).

Um die Gesamtaktivität zu erhalten, wurde das Homogenat bei nur 6.000xg in 15 Min. von gröberen Gewebs- und Zellteilen befreit. (Sorvall RC2, GSA-Rotor, 5.700 U./Min.). Der Überstand bildete die Stufe I. Dieser Rohextrakt war bei 0°C aufbewahrt noch nach 5 Tagen als Ausgangsmaterial für das beschriebene Anreicherungsverfahren zu verwenden.

Ammoniumsulfatfällung bei 42 % bis 78 % Sättigung

In je 1 Liter Rohextrakt wurden zur 42-prozentigen Sättigung 260g festes Ammoniumsulfat sehr langsam unter Rühren mit einem Teflonstab auf einem Magnetrührer zugefügt. Dabei wurde eine Plexiglasschraube, die motorgetrieben das Ammoniumsulfat durch einen Trichterausfluß hinunterdreht, verwendet. Nach der Zugabe wurde noch 30 Min. weiter gerührt. Dann wurde bei 20.000xg in 15 Min. das ausgefällte Protein abzentrifugiert. Bei der jetzt vorliegenden Salzkonzentration enthielt der Überstand die gesamte Enzymaktivität.

Das enzymatisch aktive Protein konnte durch weitere Zugabe von 270g Ammoniumsulfat zum Liter Überstand (78 % Sättigung) gefällt werden. Der Niederschlag wurde anschließend in 15 Min. bei 20.000xg gewonnen und enthielt etwa 90 % der Enzymaktivität.

Mit diesem Schritt konnte je nach Plazenta eine 2- bis 3-fache Reinigung erreicht werden: Stufe II.

Beim Heraufsetzen der unteren Ammoniumsulfatkonzentration des ungewöhnlich breiten Schnitts erhält man bei großem Verlust von etwa 50 % eine Fraktion, deren enzymatische Aktivität nach der Kinetik zu urteilen weniger von Nebenreaktionen beeinflusst wird. Ein engerer Ausschnitt zwischen 56 % (340g/l) und 78 % Sättigung wurde nur für orientierende Zwecke verwendet.

Hitzebehandlung

Der die Aktivität enthaltende Niederschlag aus der Ammoniumsulfatfällung wurde nach dem Abtropfen des restlichen ammoniumsulfathaltigen Überstandes in einem Kaliumphosphatpuffer pH 6,5 (Puffer II) aufgenommen.

men. Die Proteinkonzentration lag zwischen 35 und 45 mg/ml.

In einem Erlenmeyerkolben von 300 ml wurde die Lösung in einem Wasserbad von 67°C unter ständigem Rühren auf 61°C erhitzt, 2 Min. auf dieser Temperatur gehalten und sofort danach in einem Kältebad bei -16°C (s. Seite 16) wieder auf 0-2°C abgekühlt.

Das flockig ausgefallene Protein wurde bei 20.000xg in 15 Min. abzentrifugiert. Die Bedingungen des Hitzeschritts werden später diskutiert (s. IV). Das beschriebene Verfahren ergab wiederum eine zweifache Reinigung: S t u f e III.

Ammoniumsulfatfällung bei 76 % Sättigung

Eine zweite fraktionierte Fällung mit Ammoniumsulfat brachte trotz der veränderten Proteinkonzentration und des niedrigeren pH-Werts nach dem Hitzeschritt keine weitere Reinigung. Um größere Verluste zu vermeiden, wurde das Enzymprotein daher sofort durch langsames Einrühren von 530g festem Ammoniumsulfat zum Liter des Überstands nach der Hitzebehandlung ausgefällt. Es wurde durch eine Zentrifugation bei 20.000xg in 15 Min. gewonnen. Nach längerer Drainage wurde der Niederschlag in der kleinstmöglichen Menge Puffer III aufgenommen (ca.70-90ml).

Zentrifugation bei 78.000xg

Der vollständig in Puffer III gelöste Niederschlag aus der Ammoniumsulfatfällung wurde im Spinco-Rotor 30 in 120 Min. bei 78.000xg (30.000 U./Min.) von schwereren Teilchen befreit. Der Überstand bildete S t u f e IV.

Gelchromatographie an Sephadex

Mit Hilfe einer Sephadex-Gelchromatographie wurde die Proteinlösung mit dem für die Ionenaustauscherchromatographie geeigneten Puffer von niedriger Ionenstärke äquilibriert. Verwendet wurde eine Säule aus Sephadex G-25. Das mit Quarzwasser geschlämte Sephadex wurde auf einem Büchnertrichter mit 10 mM K-Phosphatpuffer (Puffer III, s. Abb.6) äquilibriert und zu einer Säule von 5 x 35 cm gegossen. Auf die Säule wurden bis zu 70 ml der zentrifugierten Proteinlösung aufgetragen. Die ge-

samte enzymatische Aktivität erschien im Ausschlußpeak: S t u f e V.

Sie war im Test zu 60 % tyrosinabhängig. Dieser Schritt ergab eine knapp 2-fache Anreicherung. Ein Teil der Farbstoffe und des Proteins wurde zurückgehalten.

Chromatographie an Ionenaustauschern

An N¹N¹-Diäthylaminoäthyl-(DEAE-) sowie an Carboxymethyl-(CM-)Cellulose konnten Ausschlußchromatographien durchgeführt werden, wenn in der Vorbehandlung der Hitzeschritt unter 62°C und 2 Min. Dauer gehalten wurde.

Chromatographie an Diäthylaminoäthylcellulose

Die DEAE-Cellulose wurde mit dem Säulenpuffer (Puffer III) äquilibriert. Für die Ausschlußchromatographie von etwa 2 g Protein in einem Volumen bis zu 90 ml wurde eine kleine Säule von 3,5 x 15 cm benötigt. Fast die gesamte Enzymaktivität war von einer Sorption ausgeschlossen und erschien im Durchlauf. Die spezifische Aktivität blieb innerhalb des Durchlaufs von gleicher Größenordnung.

Dieser Schritt brachte eine 2-fache Reinigung: S t u f e VI. Die einfache Durchführbarkeit und der geringe Verlust an Aktivität ließen die DEAE-Cellulosechromatographie trotz der relativ geringen erreichten Reinigung lohnend erscheinen. Es stellte sich weiter heraus, daß die aktiven Fraktionen über vier Tage nur etwas mehr als 10 % ihrer Aktivität verloren, wenn sie bei 0°C aufbewahrt wurden und sofort nach dem Säulenlauf Pyridoxalphosphat (0,2 mM) und Ketoglutarat (2 mM) zugesetzt worden war.

Chromatographie an Carboxymethylcellulose

Der Befund, daß die enzymatische Aktivität bei der verwendeten niedrigen Ionenstärke nicht an einen Anionenaustauscher gebunden wird, gab Anlaß, die Anwendbarkeit eines Kationenaustauschers zu überprüfen. Es wurde CM-Cellulose gewählt.

Das Austauschermaterial wurde wieder mit der 20-fachen Menge des Puffers IV (Abb.6) äquilibriert, und die von der DEAE-Cellulose gewonnenen aktiven Fraktionen mit insgesamt etwa 400 mg Protein in 50 ml Lösung wurden über Nacht bei viermaligem Pufferwechsel gegen Puffer IV

dialysiert. Ein sehr kleines Säulchen aus CM-Cellulose von 1,5 x 5 cm nahm die gesamte Proteinmenge auf, da eine schwache Adsorption für eine 7-fache Konzentrierung ausreichte. Die enzymatische Aktivität erschien beim Eluieren mit Puffer V (Abb.6) in den ersten Fraktionen. 70 - 80 % der aufgetragenen Aktivitätsmenge erschien unter dieser Bedingung, so daß auch hier auf das Anlegen eines Gradienten verzichtet werden konnte. Diese zweite sehr einfache Ausschluchromatographie erbrachte noch eine 4-fache Steigerung der spezifischen Aktivität:
S t u f e VII.

Insgesamt wurde bis zu dieser Stufe eine etwa 50-fache Anreicherung erzielt. Die Verluste gegenüber der Ausgangsaktivität hielten sich in erträglichen Grenzen: Die Ausbeute betrug etwa 30 %. Das nach der CM-Cellulosechromatographie konzentrierte Protein der Stufe VII (75 - 100 mg/ 7 - 10 ml) zeigte nach vier Tagen Lagerung bei 0°C noch über 50 % seiner Aktivität.

B ENZYMAUSBEUTEN UND EIGENSCHAFTEN EINIGER FRAKTIONEN AUS PLAZENTA

Die auf den einzelnen Stufen der Enzymreinigung gefundenen Mengen an Protein und Gesamtaktivität, sowie die spezifischen Aktivitäten sind in Tabelle 3 zusammengefaßt:

Tab. 3. In einer typischen Plazenta (30) erreichte spezifische Aktivitäten und Ausbeuten.

Nach	Stufe	Protein (mg)	spez. Akt. ($\frac{\mu\text{MolpHPP}}{\text{mgProt.} \cdot \text{Min}}$)	Gesamt-Akt. ($\mu\text{MolpHPP/Min.}$)
Rohextrakt	I	19.480 (16.650)*	1,45 (2,2)*	28.200 (36.600)*
AmS-Fällung	II	8.000 (10.700)	3,2 (3,25)	24.600 (34.500)
2 Min. 60°C	III	3.120 (6.200)	6,75 (6,0)	21.000 (19.200)
2 h 78.000xg	IV	2.400	7,0	16.800
Sephadex G-25	V	1.460	11,1	16.200
DEAE-Cellulose	VI	680	18,4	12.500
CM-Cellulose	VII	110	75,5	7.950

* In Klammern Mittelwerte für die Plazenten 17 und 22, deren Rohextrakte höhere spezifische Aktivitäten zeigten.

Es wurden auf einigen Stufen mehrere Präparationen verglichen. Die Bestimmungen wurden alle nach dem Verfahren nach DIAMONDSTONE (19) ausgeführt. Die Extinktionsmessungen bei 331 nm ergaben Blindwerte um 0.065 OD, während die Vollwerte bei 0.170 OD lagen. Es wurden die Differenzen ausgewertet und in $\mu\text{Mol pHP}$ umgerechnet. Die Gesamtausbeute liegt bei ca. 50 facher Reinigung um 25 %. Bei der Beurteilung dieser Werte wird man die sehr niedrige Anfangsaktivität auf der einen und die beschränkte Stabilität des Endproduktes auf der anderen Seite berücksichtigen müssen.

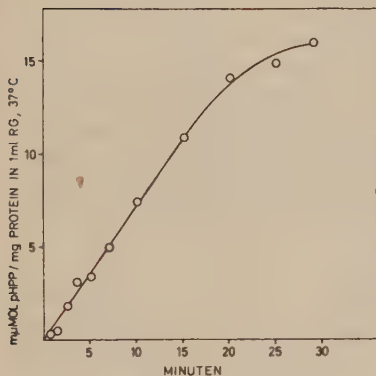


Abb.7. Zeitkurve der Umsetzung von Tyrosin im para-Hydroxyphenylpyruvat (pHP) durch das Plazentaenzym, der Stufe VI.

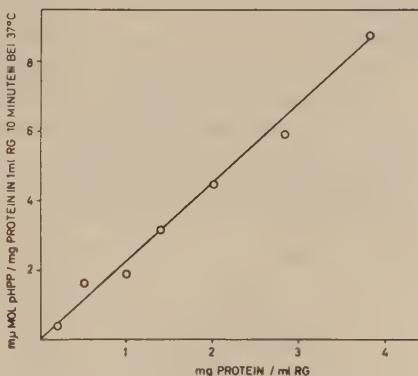


Abb.8. Enzymkonzentrationskurve für das Testsystem, in dem die Umsetzung von Tyrosin im para-Hydroxyphenylpyruvat (pHP) durch das Plazentaenzym Stufe IV gemessen wurde.

Das Testverfahren erscheint trotz der relativ hohen Blindwerte anwendbar zu sein. Die Abb. 7 zeigt die Kinetik eines nach Tabelle 2 zusammengesetzten Standardsystems. Die Umsetzung zu pHP verläuft über 15 Min. mit konstanter Geschwindigkeit, so daß die gewöhnlich ausgewerteten Messungen nach 1, 3 und 10 Min. mindestens einen Wert im linearen Bereich der Zeitkurve ergaben. Wie demnach zu erwarten, ergab sich auch eine lineare Abhängigkeit der Anfangsgeschwindigkeiten von der eingesetzten Enzym- oder Proteinmenge in Abb.8. Die Linearität beider Kurven sprach für die Stabilität des Produkts pHP in den Reaktionssystemen mit Enzymfraktionen ab Stufe III, der Stufe nach dem Hitzeschritt.

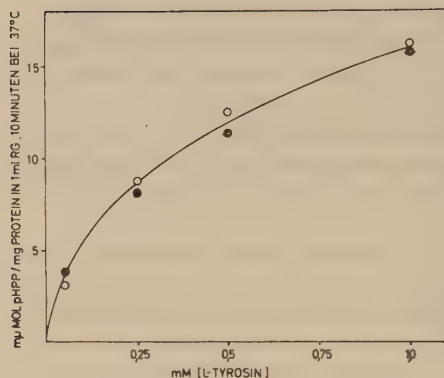


Abb. 9. Substratkonzentrationskurve: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom Substrat L-Tyrosin. Plazentaenzym Stufe VI. *Doppelbestimmung nach 24 h.

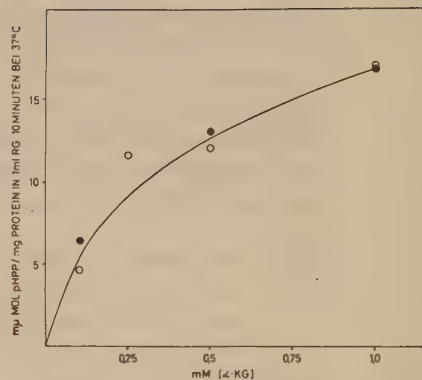


Abb. 10. Substratkonzentrationskurve: Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit vom Substrat α-Ketoglutarat. Plazentaenzym Stufe VI. *Doppelbestimmung nach 24 h.

Eine Abhängigkeit der Umsetzung besteht für L-Tyrosin und α-Ketoglutarat. Die Kurven der Abb. 9 und 10 wurden bei einer saturierenden Menge frischen Pyridoxalphosphats (s. Tab. 2) aufgenommen. Die Konzentrationen für das jeweils komplementäre Substrat wurden auf 1 mM festgesetzt. Eine vollständige Substratsättigung wurde nicht erreicht. Für L-Tyrosin, dessen Löslichkeitsgrenze bei 4 mM liegt, dürfte sie nach den Befunden beim Rattenleberenzym (32) nicht zu erreichen sein. Die Substratsättigung durch α-Ketoglutarat tritt beim Rattenleberenzym mit 3,5 mM ein. Es wurde dort ein K_m -Wert von $7 \times 10^{-4} M$ gefunden (32). Wenn die Kurve der Abb. 10 auch die genaue Bestimmung nicht zulässt, so läßt sie doch einen Wert in ähnlicher Größenordnung vermuten.

IV. DISKUSSION

Aus der Gruppe der Gewebsenzyme des Menschen konnte Tyrosintransaminase in der Plazenta nach etwa 4facher Anreicherung mit den üblichen photometrischen Bestimmungsmethoden regelmäßig nachgewiesen werden. In besonders günstigen Plazenten waren die Aktivitäten schon in den Rohextrakten mit dem Verfahren nach Diamondstone (19) bestimmbar. Dadurch ließen sich die Bedingungen für eine Anreicherung auch für die frühen Stufen ausarbeiten. Ab Stufe III (vgl. Abb.3) konnte die Enzymaktivität auch im modifizierten Ansatz nach Briggs (vgl. Tab.1) nachgewiesen werden.

Ein sehr empfindlicher Test mit radioaktivem Substrat von hoher spezifischer Aktivität wurde dadurch erschwert, daß das Enzym sehr große Substratmengen zum Erreichen seiner maximalen Umsetzungsrate benötigt. Die hohe Substratmenge belastet die Abtrennung des Produkts in einem chromatographischen Verfahren. Dieses Verfahren wurde zwar nicht für den Routinegebrauch weiterentwickelt, doch erbrachte es einen unabhängigen Nachweis von Tyrosintransaminaseaktivität in der Rohfraktion aus Plazenta.

Die geringe spezifische enzymatische Aktivität unseres Ausgangsmaterials ließ nie eine Kinetik erster Ordnung in den Rohfraktionen nachweisen. Die Aktivitätsmessung erfolgte deshalb bei den Stufen I-III über das relativ kurze Intervall von 3 Minuten. Die Reaktion wurde daher durch die Zugabe der in Eis aufbewahrten Fraktionen gestartet und die Zunahme des pHPP zu drei verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. War die Hitzebehandlung durchgeführt, konnte man die Meßdauer auf 10 Minuten und länger ausdehnen.

Die aufgezählten Schwierigkeiten erklären vielleicht die geringe Zahl von Veröffentlichungen über Enzyme aus der Plazenta. Unsere Ergebnisse zeigen aber die grundsätzliche Möglichkeit, aus der Plazenta gewonnene Enzyme zu allgemeinen Untersuchungen heranzuziehen.

Das Enzymprotein verhielt sich bei der Aufarbeitung und den wenigen untersuchten Eigenschaften weitgehend wie die Tyrosintransaminase aus Rattenleber.

Es hatte sich früh herausgestellt, daß die zwischen 22⁰⁰ und 2⁰⁰ geborenen Plazenten mehr Enzymaktivität enthalten. Der Befund wurde indirekt durch Veröffentlichungen über den Tagesverlauf der Serumkonzentrationen an Tyrosin beim Menschen bestätigt (35, 36). Er deckte sich gleichzeitig auch mit den Ergebnissen von Untersuchungen über den Tagesrhythmus der Enzymaktivität in Rattenleber (37, 38).

Die Oberflächenempfindlichkeit des Enzyms aus Rattenleber ließ einem besonders schonenden Homogenisierverfahren den Vorzug geben (39, 9). Bei der Plazentapräparation konnte wegen des starken Bindegewebsgerüsts auf das Homogenisieren mit Hilfe von Schwerkraft im Ultra-Turrax nicht verzichtet werden. Gute Enzymausbeuten ließen sich damit aber nur erzielen, wenn in der angegebenen schonenden Weise verfahren wurde.

Der breite Ammoniumsulfatschnitt zwischen etwa 40 % und 80 % mußte bisher für alle untersuchten Ausgangsgewebe gewählt werden (9, 31, 40). Die Schutzwirkung des schwach sauren Milieus und des α -Ketoglutarats ist seit den ersten Reinigungsversuchen bekannt (9).

Verglichen mit dem Rattenleberenzym reagierte die enzymatische Aktivität unserer Proteinfraction empfindlicher auf eine Hitze von über 62°C. Die über 66°C erhitzten Fraktionen hatten beispielsweise nach 24-30 Stunden ihre gesamte Aktivität verloren. Chromatographierte man innerhalb dieser Zeitspanne die erhitzten Fraktionen auf DEAE-Cellulose, so erhielt man in drei verschiedenen Elutionsbereichen eines von 0 bis 200 mM KCl und von pH 7,6 bis pH 6,0 in 200 mM K-Phosphat führenden Gradienten enzymatische Aktivität (K-EDTA und DTT waren je 1 mM). Im Proteindurchlauf bei 200 mM K-Phosphat pH 7,6 (dem Ausgangspuffer) fand sich ein relativ um so kleinerer Anteil der Aktivität, je höher die Temperatur bei der Hitzebehandlung gewählt worden war; die Sorption stieg also mit der Höhe der angewendeten Temperatur. Wurde dann mit dem Salz- und pH-Gradienten eluiert, so erhielt man bei 270 mM Gesamtsalz eine zweite und bei 380 mM eine dritte Fraktion mit ausgezeichneter spezifischer Aktivität, die allerdings innerhalb von drei Stunden vollständig verschwand. Die Zugabe von α -KG, P_{ph} oder krist. Rinderserumalbumin (3 mg/ml) konnte den Verfall der Aktivität nicht aufhalten.

Eine Auftrennung in drei enzymatisch aktive Proteinfractionen findet bei der Rattenleberpräparation während einer Elektrophorese statt (25). Die gefundene außergewöhnlich feine Trennung an der DEAE-Cellulose könnte auf die stärkere Schädigung durch die hohe Erhitzung oder auf die geringe Konzentration des Enzymproteins an der Cellulose zurückzuführen sein. Ähnlich könnte die höhere Empfindlichkeit während des Hitzeschritts durch die starke Verdünnung des Enzyms mit Fremdproteinen erklärbar sein.

Die Gelfiltration ließ bedingte Rückschlüsse auf das Molekulargewicht des Enzyms zu. Es ist für die Tyrosintransaminase aus Rattenleber aus mit ca. 91.000 bestimmt. Nimmt man einen Wert gleicher Größenordnung für das mensch-

liche Enzymprotein an, so sollte eine Ausschlußchromatographie an Sephadex G-25 sicher möglich sein. Sephadex G-75 könnte dagegen die Enzymaktivität auch verzögert abgeben. Tatsächlich wurde bei Verwendung von Sephadex-G-75-Gel eine zusätzliche Auftrennung der enzymatischen Aktivität in zwei ineinander übergehende, aber deutlich verschieden schnell laufende Aktivitätsgipfel gefunden. Während der zuerst erscheinende Anteil im verwendeten Test regelmäßig voll substratabhängig war, erwies sich die Enzymaktivität des zweiten Gipfels nur zu 60 % tyrosinabhängig. Die verzögert erscheinende Aktivität entsprach etwas mehr als der Hälfte der aufgetragenen Menge. Da mit Sephadex G-75 keine höhere Reinigung als durch Anwendung von Sephadex G-25 erreicht wurde, das Protein danach aber stark verdünnt vorlag, wurde für die Vorbereitung der DEAE-Cellulosechromatographie die Gelfiltration über Sephadex G-25 eingesetzt.

Die geringe Adsorption des Enzymproteins an beide Ionenaustauscherarten sowie die gute Stabilität der Aktivität nach den bisherigen Reinigungsschritten deuten darauf hin, daß das Enzymprotein nur wenig angegriffen worden ist. Die gewonnene Fraktion dürfte daher geeignet sein, eine weitere Anreicherung zu überstehen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Tyrosintransaminasaktivität wurde in menschlicher Plazenta nachgewiesen und daraus angereichert. Die Wahl des Enzyms erfolgte in Hinblick auf die besonderen Kenntnisse über die Regulation seiner Biosynthese im Säugerorganismus und auf seine geplante Synthese *in vitro*.

Da es sich nicht um ein Leitenzym des Ausgangsgewebes handelte, mußten besonders empfindliche Nachweisverfahren angewendet werden.

Die Anreicherung erfolgte mit Hilfe einer fraktionierten Ammoniumsulfatfällung, einer Hitzebehandlung und von Ausschlußchromatographien an einem Anionen- und einem Kationenaustauscher.

Es wurde eine 50-fache Anreicherung bei einer Ausbeute von über 25 % der Aktivität erzielt. Das angereicherte Enzym behielt 50 % seiner Aktivität nach 4-tägiger Lagerung bei 0°.

VI LITERATUR

1. LIN, E.C.C., and W.E.KNOX.
Adaption of Rat Liver Tyrosine- α -Ketoglutarate Transaminase.
Biochim. Biophys. Acta 26, 85 (1957).
2. LIN, E.C.C., and W.E.KNOX.
Specificity of the Adaptive Response of Tyrosine- α -Ketoglutarate
Transaminase in the Rat.
J. Biol. Chem. 233, 1186 (1958).
3. SERENI, F., F.T.KENNEY, and N.KRETCHMER.
Factors influencing the Development of Tyrosine- α -Ketoglutarate
Transaminase Activity in Rat Liver.
J. Biol. Chem. 234, 609 (1959).
4. KENNEY, F.T., and R.M.FLORA.
Induction of Tyrosine- α -Ketoglutarate Transaminase in Rat Liver.
I. Hormonal Nature.
J. Biol. Chem. 236, 2699 (1961).
5. HOLTEN, D., and F.T.KENNEY.
Mechanism Controlling Hepatic Enzyme Synthesis
Fed. Proc. 25, 285 (1966).
6. CSANYI, V., O.GREENGARD, and W.E.KNOX.
The Induction of Tyrosine Aminotransferase by Glucagon and Hydro-
cortisone.
J. Biol. Chem. 242, 2688 (1967).
7. TEEBOR, G.W., F.F.BECKER, and I.SEIDMAN.
Hydrocortisone Induction of Tyrosine Transaminase in Regenerating
Rat Liver.
Nature, 216, 396 (1967).
8. KORNER, A., and F.LABRIE.
Induction of Tyrosine Aminotransferase and Tryptophanpyrrolase.
Bloch. J. 105, 49 (1967).
p
9. KENNEY, F.T.
Induction of Tyrosine- α -Ketoglutarate Transaminase in Rat Liver.
II. Enzyme Purification and Preparation of Antitransaminase.
J. Biol. Chem. 237, 1605 (1962).
10. THOMPSON, E.B., G.M.TOMKINS, and J.F.CURRAN.
Induction of Tyrosine- α -Ketoglutarate Transaminase by Steroid
Hormones in a Newly Established Tissue Culture Cell Line.
Proc. Natl. Acad. Sci. 56, 296 (1966).
11. TOMKINS, G.M., E.B.THOMPSON, S.I.HAYASHI, T.D.GELEHRTER, D.GRANNER,
and B.PETERKOFISKY.
Tyrosin Transaminase Induction in Mammalian Cells in Tissue Culture.
Cold Spring Harbor Symp. XXXI, 349 (1966).

12. GELEHRTER, T.D., and G.M.TOMKINS.
The Role of RNA in the Hormonal Induction of Tyrosine Aminotransferase in Mammalian Cells in Tissue Culture.
J. Mol. Biol. 29, 59 (1967).
13. GARREN, L.D., R.R., HOWELL, G.M.TOMKINS, and R.M.CROCCO.
A Paradoxical Effect of Actinomycin D.
The Mechanism of Regulation of Enzyme Synthesis by Hydrocortisone.
Proc. Natl. Acad. Sci. 52, 1129 (1964).
14. PETERKOFKY, B., and G.M.TOMKINS.
Effect of Inhibitors of Nucleic Acid Synthesis on Steroid-mediated Induction of Tyrosine Aminotransferase in Hepatoma Cell Cultures.
J. Mol. Biol. 30, 49 (1967).
15. BENSON, P.F., and P.M.YOUNG.
Suppression by Actidione of Development of Rat Liver L-Tyrosine-2-oxoglutarate Aminotransferase Activity.
Science 159, 97 (1968).
16. MATTHAEI, J.H., and G.K.SCHOECH.
Human Gene Expression I: An Aminoacyl-tRNA binding System from human Placenta.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 27, 638 (1967).
17. NETH, R., G.HELLER und H.MATTHAEI.
Menschliche Proteinsynthese, III: Präparation von Ribosomen, Transfer-RNA und Aminoacyl-Transfer-RNA-Synthetasen aus Operations- und Biopsiematerial.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 349, 1514 (1968).
18. MERTELSMANN, R., und H.MATTHAEI.
Isolation and Purification of DNA-dependent RNA Polymerase from Nuclei of human Placenta.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 33, 136 (1968).
19. DIAMONDSTONE, T.I.
Assay of Tyrosine Transaminase Activity by Conversion of p-Hydroxyphenylpyruvate to p-Hydroxybenzaldehyde.
Analyt. Biochem. 16, 395 (1966).
20. WEINSTEIN, A., G.MEDES, and G.LITWACK.
Isotopic Method for Tyrosine Transaminase Activity.
Analyt. Biochem. 21, 86 (1967).
21. HIRD, F.R.J., and E.V.ROWSELL.
Additional Transaminations by Insoluble Particle Preparations of Rat Liver.
Nature 166, 517 (1950).
22. RUDMAN, D., and A.MEISTER.
Transamination in *Escherichia Coli*.
J. Biol. Chem. 200, 591 (1953).

23. PITT, B.M., and W.E.KNOX.
 α -keto-acid-keto-enol tautomerase.
Fed. Proc. 15, 327 (1956).
24. LIN, E.C.C., B.M.PITT, M.CIVEN, and W.E.KNOX.
The Assay of Aromatic Acid Transaminations and Keto Acid Oxydation
by the Enol Borate - Tautomerase Method.
J. Biol. Chem. 233, 668 (1958).
25. CANELLAKIS, Z.N., and P.P.COHEN.
Purification Studies of Tyrosine- α -Ketoglutarate Acid Transaminase.
J. Biol. Chem. 222, 53 (1956).
26. ASPEN, A.C., and A.MEISTER.
Determination of Transaminase.
Meth. Biol. Anal. 6, 131 (1959).
27. EWALD und HÜBNER.
Bestimmung der Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase.
Naturwissenschaften 48, 720 (1961).
28. PITT, B.M.
Oxidation of Phenylpyruvates to Aromatic Aldehydes and Oxalate.
Nature, 196, 272 (1962).
29. JACOBY, G.A., and B.N.LA DU.
Studies on the Specificity of Tyrosine- α -Ketoglutarate Transaminase.
J. Biol. Chem. 239, 419 (1964).
30. MATTHAEI, H., G.HELLER, H.-P.VOIGT, R.NETH, G.SCHÖCH, and H.KÜBLER.
Analysis of the Genetic Code by Amino Acid Adapting. Genetic
Elements, Properties and Function.
Academic Press, Polian Scientific Publishers, Wazawa 1966.
31. LOWRY, O.H., N.J.ROSEBOROUGH, A.L.FARR, and R.J.RANDALL.
Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).
32. HAYASHI, S.I., D.K.GRANNER, and G.M.TOMKINS.
Tyrosine Aminotransferase. Purification and Characterisation.
J. Biol. Chem. 242, 3998 (1967).
33. REMMER, H.
Die Induktion arzneimittelabbauender Enzyme im endoplasmatischen
Retikulum der Leberzelle durch Pharmaka.
Dtsch. Med. Wschr. 92, 2001 (1967).
34. COLOWICK, S.P., and N.O.KAPLAN.
Methode in Enzymology I,
Academic Press Inc., Publishers, New York 1955. pp. 72-78.
35. FEIGIN, R.D., A.S.KLAINER, and W.R.BEISEL.
Circadian Periodicity of Blood Amino Acids in Adult Men.
Nature 215, 512 (1967).

36. WURTMAN, R.J., C. CHOU, and C.M. ROSE.
Daily Rhythm in Tyrosine Concentration in Human Plasma: Persistence on Low Protein Diets.
Science 158, 3809, 660 (1967).
37. WURTMAN, R.J., and J. AXELROD.
Daily Rhythmic Changes in Tyrosine Transaminase Activity in Rat Liver.
Proc. Natl. Acad. Sci. 57, 1594 (1967).
38. WURTMAN, R.J., W.J. SHOEMAKER, and F. LARIN.
Mechanism of the Daily Rhythm in Hepatic Tyrosine Transaminase Activity: Role of Dietary Tryptophan.
Proc. Natl. Acad. Sci. 59, 800 (1968).
39. CANELLAKIS, Z.N., and P.P. COHEN.
Kinetic and Substrate Specificity Study of Tyrosine- α -Ketoglutaric Acid Transaminase.
J. Biol. Chem. 222, 63 (1956).
40. IGO, E.P., C.P. MAHONEY, and G.A. LIMBECK.
Studies on Tyrosine- α -Ketoglutarate Transaminase from Bovine Thyroid and Liver Tissue.
Biochim. Biophys. Acta 151, 88 (1968).

ABKÜRZUNGEN

Ci	Curie
CM-Cellulose	Carboxymethylcellulose
DDC	Diäthylthiocarbamat
DEAE-Cellulose	N'-N'-Diäthylaminocellulose
DTT	Dithiothreitol (CLELAND's Reagenz)
α -KG	α -Ketoglutarat
K-EDTA	Kaliumäthylendiamintetraessigsäure
lpm	Impulse pro Minute
L-Tyr	L-Tyrosin
MEt	B-Mercaptoäthanol
OD ₃₃₁	Optische Dichte bei 331 nm
pHBA	para-Hydroxybenzaldehyd
pHPP	para-Hydroxyphenylpyruvat
P ₁ ph	Pyridoxalphosphat
POPOP	1,4-bis-2-(5-Phenyloxazolyl)-benzol
PPO	2,5-Diphenyloxazol
mRNS	Messenger- oder Botenribonucleinsäure
TCE	Trichloressigsäure

Herrn Dr. Matthaei gilt für die Einführung in wissenschaftliches Arbeiten und vielfältige Anregungen mein besonderer Dank.

Den Herren Professoren Dr. H. Kirchhoff und Dr. H. Kräubig, Herrn Dozent Dr. U. Herlyn sowie den Hebammen der Universitätsfrauenklinik und der Krankenhäuser Neu-Bethlehem und Neu-Maria-Hilf danke ich für die unentbehrliche und jederzeit freundlich gewährte Unterstützung.

LEBENS LAUF

Als Sohn des Bankangestellten Karl Pralle und seiner Ehefrau Amalie, geb. Möhrmann, wurde ich am 13.9.1941 in Bremen geboren.

Von 1954 an besuchte ich das Gymnasium am Barkhof in Bremen, wo ich 1961 die Reifeprüfung ablegte.

Zum Sommersemester 1961 nahm ich das Medizinstudium in Freiburg auf und legte dort im Herbst 1963 die ärztliche Vorprüfung ab. Nach je einem Semester in Hamburg und Kiel setzte ich das klinisch-medizinische Studium in Giessen fort, wo ich es im Februar 1967 mit der ärztlichen Prüfung abschloß.

Seither war ich als Medizinalassistent am Max-Planck-Institut für experimentelle Medizin in Göttingen tätig, wo ich auch die vorliegende Dissertation unter der Leitung von Herrn Priv.-Doz. Dr. J.H. Matthaei anfertigte.

Im April 1968 begann meine klinische Ausbildung als Medizinalassistent in der Chirurgischen Klinik des Zentralkrankenhauses Bremen-Nord unter der Leitung von Prof.Dr.Dr.J.U. Wassner. Sie wird fortgesetzt in der Frauenklinik der Städtischen Krankenanstalten in Bremen unter Leitung von Dr.E.H.Bartels. Ich hoffe, nach weiterer Ausbildung in der medizinischen Klinik der Universität in Giessen unter Prof.Dr.H.A.Kühn, Prof. Dr.H.J.Dengler und Prof. Dr.H.G.Lasch zum Juli 1969 die Approbation als Arzt zu erhalten.

